

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12N 7/01

C12N 15/45 C12N 15/86

C12P 21/02

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 96199476.2

[43]公开日 1999年2月3日

[11]公开号 CN 1207124A

[22]申请日 96.10.22 [21]申请号 96199476.2

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

[30]优先权

代理人 巫肖南

[32]95.11.1 [33]JP [31]285417/95

[86]国际申请 PCT/JP96/03069 96.10.22

[87]国际公布 WO97/16539 日 97.5.9

[85]进入国家阶段日期 98.7.1

[71]申请人 株式会社载体研究所

地址 日本茨城县

[72]发明人 永井美之 加藤笃 村井深
坂田恒昭 长谷川护 盐田达雄

权利要求书2页 说明书17页 附图页数3页

[54]发明名称 重组仙台病毒

[57]摘要

一种用于重建仙台病毒颗粒的方法，其包括将仙台病毒基因组导入其中所有早期复制基因已经表达的宿主中。该方法使能进行仙台病毒的基因操作，并因而使得可能有效利用仙台病毒作为载体。

酶表达单位的重组痘苗病毒之间的重量比的有效条件。此外，本发明人获得了正链和负链的全长 cDNA，构建了诱导仙台病毒的正或负链 RNA 的细胞内生物合成的质粒，并将所述质粒转移到表达涉及转录和复制的 cDNA 的宿主细胞。结果，他们成功地从仙台病毒颗粒的 cDNA 重建了仙台病毒颗粒。

5 本发明人还首次发现，对于有效重建病毒颗粒，环形的导入宿主细胞的 cDNA 比链形的更为优选，并且在高度成功地重建病毒颗粒的细胞内转录方面，正链 RNA 优于负链 RNA。

另外，本发明发现即使不用重组痘苗病毒作为 T7RNA 聚合酶表达单元，也可能重建仙台病毒。即，在体外转录的仙台病毒的全长 RNA 被转移至细胞中且编码用于初转录和复制的酶的 cDNA 在 T7 启动子的控制下转录时，重建病毒颗粒。这表明，如果建立起表达初转录和复制所需的所有酶的细胞，可以完全不用诸如痘苗病毒的辅助病毒来产生重组的仙台病毒。由于已描述表达初转录和复制所需的所有酶的细胞[“病毒学杂志”(J.Virology)68, 8413-8417(1994)]，本领域的那些熟练技术人员能够参考所述文章制成这样的细胞。所述参考中描述的细胞是染色体上携带仙台病毒基因的三种基因如NP, P/C 和 L 并表达由这三种基因 NP, P/C 和 L 编码的蛋白的 293 细胞系的一种衍生型。

如果能够从核酸有效重建病毒颗粒，显然由多例病毒载体本领域中的那些熟练技术人员能够容易地替换所需的基因、插入外源基因或灭活或缺失目的病毒基因。即，对于本领域的那些熟练技术人员来说，显然通过本发明在重建仙台病毒颗粒方面的首次成功已使仙台病毒的基因操作成为可能。

即，本发明包括下列内容：

1. 一种重组的仙台病毒，其具有带有插入的目的外源基因或缺失或灭活的目的基因的基因组，并保留了传播能力。
2. 描述 1 的重组仙台病毒，其中，一个以上的编码功能蛋白的基因被修饰。
3. 描述 1 或 2 的重组仙台病毒，其含有能在宿主细胞中表达的外源基因。
4. 一种 RNA 分子，其含有描述 1 - 3 中任一项的重组仙台病毒中所具的 RNA。
5. 一种 RNA 分子，其含有描述 1 - 3 中任一项的重组仙台病毒中所具

可以获得本发明的重组仙台病毒载体，例如，通过体外转录编码基因技术产生的重组仙台病毒载体基因组的重组 cDNA，产生重组仙台病毒基因组 DNA，并将所述 RNA 导入宿主并同时表达仙台病毒的 NP、P/C 和 L 蛋白(每种蛋白均可以是具有相当活性的蛋白)。或者可通过将 a) 编码基因技术产生的 5 重组仙台病毒载体基因组的重组 cDNA，以及 b) 一种能在胞内以所述 DNA 作模板转录 RNA 的单位导入宿主同时表达仙台病毒的 NP、P/C 和 L 蛋白(每种蛋白均可以是具相当活性的蛋白)而获得本发明的重组仙台病毒载体。在这一情况下，所述重组 cDNA a) 可以插入到特异启动子的下游，并且所述转录单位 b) 可以是表达作用于所述特异启动子的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶的 10 DNA 分子。

作为插入所需外源基因，或者缺失或灭活所需基因的本发明起始材料，仙台病毒可以是一个归类于 I 型副流感病毒的毒株，如仙台病毒 Z 毒株或 Fushimi 毒株。此外，诸如 DI 颗粒、合成的寡核苷酸等的不完全病毒可以是使用的部分材料。

而且，只要本发明的重组仙台病毒保留传播能力，任何外源基因都可以插入到所述重组子所含 RNA 的任何位点，并且可以缺失或修饰任何基因组基因。待插入的外源基因可以以编码能在宿主中表达的各种细胞因子和肽类激素的基因为例。为表达所需的蛋白，插入了编码所述所需蛋白的外源基因。优选在仙台病毒的 RNA 中于序列 R1(5' - AGGGTCAAAGT - 3') 和 R2(5' - 20 GTAAGAAAAA - 3') 之间插入一段 6 个数目扩增的碱基的序列。[“病毒学杂志”(Journal of Virology),67 卷, 第 8(1993), 4822 - 4830 页]。插入到载体的外源基因的表面水平可以由基因插入位点和所述外源基因的侧翼碱基序列来调节。例如，在仙台病毒 RNA 的情况下，已知随着所述基因离 NP 基因的距离减小，插入基因的表达量增加。优选的用于表达所需蛋白的宿主 25 可以是任何易受重组仙台病毒感染的细胞，例如哺乳动物细胞和鸡卵。可能通过用整合可表达外源基因的重组仙台病毒感染这些宿主并回收表达的基因产物来有效地产生外源基因产物。例如，这样表达的蛋白可在培养的细胞是宿主时从培养基以及鸡卵是宿主时从绒毛膜尿囊液用标准方法回收。

当外源基因插入用于表达负链仙台病毒 RNA 的质粒时，需要以用于转 30 录编码蛋白的所述外源基因的反义 RNA 的方向将所述外源基因插在启动子的方向。通过本发明，已首次使可以获得这样的“用于表达由整合到仙台病

通过 HA 实验评估病毒产物。结果示于表 3。

表 3

模板 cDNA (微克)	总量 (微克)	pGEM - L (微克)	pEGM - P/C (微克)	pGEM - NP (微克)	培养时间 (小时)	培养细胞 的数目	HAU	PFU
体外 (-)RNA	10	4	2	4	40	1.00×10^6	512	2×10^9
体外 (-)RNA	10	4	2	4	40	1.00×10^6	512	ND
体外 (+)RNA	10	4	2	4	40	1.00×10^6	2	5×10^3
体外 (+)RNA	10	4	2	4	40	1.00×10^6	< 2	ND

这些结果表明能够通过将负或正义链 RNA 导入细胞来重建病毒。

实施例 5

5

插入到仙台病毒载体中的外源基因在宿主细胞中的表达

1. 插入外源基因(HIV - 1 gp120)仙台病毒载体“pSe Vgp 120”的制备
用含引物 a(5' - TGCAGGCCCGTACGGTGGCAATGAGTGAAGGAG
AAGT - 3')(序列 1)和引物 d(5' - TTGCGCCCGCGATGAACTTCACCCCTA
AGTTTTTATTACTACGGCGTACGTCATCTCTCTCTGC - 3')(序列
2)的一套引物，用标准的 PCR 技术于“pN1432”上扩增 HIV - 1gp120 基因。PCR 产物被进行 TA 克隆，用 Not I 消化，并且然后插入到“pSeV18”
的 Not I 位点。然后用重组质粒转化 E.coli 细胞。以“小量制备法”由 E.coli
的每一克隆提取 DNA，用 DraIII 消化，然后电泳。通过证实含由该插入所
预计大小的 DNA 片段来选择阳性克隆。在证实 DNA 片段具真正的核苷酸序
列后，通过氯化铯密度梯度离心纯化 DNA。下文将插入有 gp120 基因的 pSe
V18 称作“pSe Vgp120”。

2. 含 pSeVgp120(SeVgp120)的仙台病毒的重建和对 gp120 表达的分析
除开在 pGEM - NP，pGEM - P/C 和 pGEM - L 之外，还将 pSe
Vgp120 转染到 LLCMK2 细胞中，除此之外完全如实施例 2 中所述由含胚鸡

卵回收绒毛尿囊液并分析病毒 HAU。再如下通过 ELISA 检测回收病毒的 gp120 表达

把样品(各 $100 \mu l$)分加到已用抗 HIV - 1 的单克隆抗体包被过的 96 - 孔板的每一孔中，并于 $37^\circ C$ 下培养 60 分钟。用 PBS 洗涤后，向每孔加入 5 HRP - 连结的抗 HIV - 1 抗体(各 $100 \mu l$)，并于 $37^\circ C$ 下培养 60 分钟。用 PBS 洗涤后，向每孔加入四甲基联苯胺，通过按照 450nm 处的光密度测定酸性条件下由 HRP 作用转化的反应产物的量来估计 gp120 的表达量。结果示于表 4 的左栏中。

把这样获得的病毒溶液接种到 CV - 1 细胞中并如下同样检测。把 CV 10 - 1 细胞以 5×10^5 细胞/板分散到培养板，生长，然后弃去培养基。用 PBS(-) 洗涤后，以感染复数 10 将病毒溶液加到细胞中，并于室温下培养 1 小时。弃去病毒溶液后，用 PBS(-) 洗涤，向细胞加入普通的(plain)MEM 培养基(补充了抗生素阿糖胞苷和利福平和胰蛋白酶的 MEM 培养基)，并于 $37^\circ C$ 下培养 48 小时。反应后回收培养基，测 HAU(以与实施例 2 中所述相同的方法) 15 并测 gp120 的表达(通过 ELISA)。结果示于表 4 的栏中。此外，再把 CV - 1 细胞培养基的上清液接种到含胚的鸡卵中，对这样获得的病毒溶液测 HAU 并检测 gp120 表达(通过 ELISA)。结果示于表 4 的右栏中。

表 4

(微克/毫升)

绒毛膜尿囊液 (F1)gp120(HAU)	CV - 1 培养基 (F1)gp120(HAU)	绒毛膜尿囊液 (F2)gp120(HAU)
0.10(4)	3.46(128)	
0.15(32)	1.81(128)	1.56, 1.21 (512, 512)
0.05(32)	2.20(128)	

如表 4 中所示，检测到培养中 CV - 1 细胞中相当高浓度的 gp120(表的中栏)，在再用病毒接种的含胚鸡卵的绒毛膜尿囊液中也一样(表的右栏中)。表的左栏和中栏中示三个克隆的平均值。

此外，以 Western 印迹分析 gp120 的表达。于 20,000rpm 离心以 SeVgp120 感染的 CV - 1 细胞的培养基 1 小时来沉淀病毒后，于冰上用 TCA(10 %, v/v) 或于 $-20^\circ C$ 下用 70 % 乙醇处理上清液后，于 15,000rpm 离心 15 分钟。

于 90 °C 下混合这样沉淀的蛋白质以和“SDS - PAGE 样品缓冲液”(Daiichi Chemicals)反应 3 分钟，然后于 10 % SDS - PAGE 上进行电泳。把这样分离的蛋白转移到 PVDF 膜(Daiichi Chemicals)上，于室温下和单克隆抗体 902 反应 1 小时，然后用 T - TBS 洗涤。于室温下把该膜和抗 - mIgG(Amersham) 5 反应 1 小时，并用 T - TBS 洗涤。然后于室温下把该膜与 HRP - 连接的蛋白 A(Amersham)反应 1 小时，用 T - TBS 洗涤，加入 4 - 氯 - 1 - 萘酚 (4CNPLus)(Daiichi Chemicals)以检测 gp120。结果，在与预计的 gp120 分子量相应的位置显色蛋白质带。

此外，分析了用 SeVgp120 转染的 CV - 1 细胞的感染后时间对 HAU 10 值和 gp120 表达量的效应。以感染复数 10 用 SeVgp120 感染分散到 10 - 厘米板的 CV - 1 细胞(5×10^6)，于感染后 30, 43, 53 和 70 小时时回收培养基(各 1ml)，与等体积新鲜培养基混合，进行 HAU 实验，gp120 表达检测 (通过 ELISA) 和 Western 印迹。结果示于图 4。如图 3 中清楚地所示，gp120 的产量趋向于随仙台病毒的 HA 滴度增加而增加。

15

实施例 6

对各种类型的细胞中 SeVgp120 增殖以及 gp120 表达水平的分析

除用不同类型的细胞外，使用与实施例 5 中的那些相同的方法，测试 HAU 和 gp120 表达水平(通过 ELISA)。结果示于表 5。

表 5

细胞类型	时间(感染后)	HAU	rgp120(微克/毫升)
CV - 1	96	32	2.5
LLCMK2	48	16	0.5
CHO	55	4	0.46
NTH3T3	48	4	0.25
MT4	24	16	0.8
MOLT4/	24	16	1.2

20 该表的左栏示用 SeVgp120 感染的各种类型的细胞的感染后时间。结果，在所有被测试的类型的细胞中检测到了 SeVgp120 增殖和 gp120 表达。

实施例 7

对宿主细胞中插入到仙台病毒载体中的荧光素酶基因的表达的研究

为分离插入到载体的荧光素酶基因，用一套引物 [5' -